

## 拡大内視鏡を用いた Aberrant crypt foci の観察

— preneoplastic lesion としての意義 —

勝 木 伸 一 高 山 哲 治

札幌医科大学内科学第4講座

### Observation of human aberrant crypt foci by magnifying endoscopy: Significance of preneoplastic lesions

Shinichi KATSUKI, Tetsuji TAKAYAMA

Department of Internal Medicine (Section 4), School of Medicine, Sapporo Medical University

**ABSTRACT** Studies on aberrant crypt foci (ACF) have been so far carried out with either surgical or autopsied specimens of the colon. In this present study, using magnifying endoscopy (Fujinon Tokyo Japan), we identified ACF in 78 normal subjects (NS), 116 adenoma patients (AP) and 27 cancer patients (CP) and examined their implication as a possible precursor for colon cancer.

ACF were readily identified by magnifying endoscopy and showed similar features to those hitherto described in stereoscopic microscopic studies. The incidence, numbers and size of ACF showed stepwise increments in the order of NS, AP, CP. In AP, the numbers of ACF were clearly correlated with the numbers of adenomas. Highly frequent mutations (87.5-100%) of K-ras were found in ACF regardless of cohorts (NS, AP and CP) or sizes. ACF are therefore likely precursors of adenomas and subsequent carcinomas. (Received October 24, 1997 and accepted November 25, 1997)

**Key words:** Aberrant Crypt Foci, Adenoma-carcinoma sequence, Magnifying endoscopy, Chemoprevention of colorectal cancer

## 1 緒 言

Aberrant crypt foci (以下 ACF) は、1987 年 Bird により大腸癌の発癌物質である azoxymethane を投与されたマウスの大腸に methylene blue に濃染する小病変として初めて報告された<sup>1)</sup>。その後ラットにおいても同様に、azoxymethane や dimethylhydrazine 投与後に ACF が発生することが報告された<sup>2),3)</sup>。これまでに、ACF は、①発癌プロモーターとして知られる chenodeoxycholic acid により、その数や大きさが増加するばかりでなく、核異型や dysplasia を伴うこと<sup>4)</sup>、②発癌に抑制的に働くと考えられる docosaheptaenoic acid や aspirin 投与によりその数は減少し、大きさも小さくなること<sup>5),6)</sup>、③proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 活性の亢進や癌遺伝子の変化 (K-ras, c-fos,) を伴うこと<sup>7),13)</sup>、が報告され、実験大腸癌の発癌過程の初期病変と考えられている。ヒトにおいても、

マウス、ラット同様に ACF の存在が確認され、大腸癌患者では大腸癌以外の患者に比べその数が多いことが知られている<sup>14)</sup>。しかしヒト ACF に関するこれまでの報告は、大腸癌患者の手術材料や少数の剖検例を対象として実体顕微鏡で観察したものであり<sup>15),16)</sup>、正常人や腺腫患者における ACF の検討はなされていない。つまり、ヒトでの adenoma-carcinoma sequence<sup>17)</sup> における意義はなお不明である。本研究では、拡大内視鏡を用いてヒト ACF を初めて観察、同定するとともに、大腸癌患者、腺腫患者、正常人における頻度、数、形態を検討し、ACF の preneoplastic lesion としての意義を明らかにした。

## 2 対象と方法

### 2.1 対 象

1994 年 6 月から 1996 年 10 月までに、新日鐵室蘭総合病院にて methylene blue 散布ならびに拡大内視鏡検

査の Informed consent が得られた症例のうち Total colonoscopy を施行できた 163 名 (ACF 数 1451 個) を対象とした。そのうち、下腹部不快感や腹部膨満感などの症状を有していながらも明らかな大腸病変を認めなかった者 (以後、正常人とする) は 52 名 (男女比 1.74, 平均年齢  $61.01 \pm 9.61$  歳), 大腸腺腫患者は 84 名 (男女比 1.71, 平均年齢  $60.19 \pm 7.81$  歳), 大腸癌患者は 27 名 (男女比 2.38, 平均年齢  $62.96 \pm 11.91$  歳) であった。またこれらの検討は、新日鐵室蘭総合病院倫理委員会の承認を得て行った。

## 2.2 拡大内視鏡による観察方法

大腸拡大内視鏡は、観察深度 4~50 mm, モニター上での拡大率約 40 倍, 高感度 CCD (41 万画素) を内蔵した EVE410CM (Fujinon, Tokyo, JAPAN) を用いた。前処置として経口腸管洗浄液 (30% polyethylene glycol 溶液 2000~4000 ml) を用いた。Total colonoscopy を施行した後、中直腸横ヒダから歯状線までの下部直腸領域を 0.5% グリセリン溶液にて洗浄した。次いで、0.25% methylene blue 溶液を散布して 2 分間放置した後、微温湯にてよく洗浄し、拡大内視鏡にて観察した。なお、3 例 (正常人 1 名, 腺腫患者 1 名, 大腸癌患者 1 名) については下部直腸領域のみならず全大腸を 0.25% methylene blue 溶液にて染色し、ACF を検索した。ACF の同定は、これまでの実体顕微鏡下の criteria に準じた<sup>15)16)</sup>。すなわち、methylene blue に濃染する crypt で直径が大きく、pericryptal space が広いものを ACF とした。また、ACF を観察する際には、crypt 数/foci が 10 個未満の小さい ACF を type S, crypt 数/foci が 10 個以上の大きい ACF を type L と分類した。ACF の病理診断は、mucosal polarity の欠如、腺管分枝、腺口径の開大という特徴を踏まえ<sup>15)16)</sup>、二人の別々の病理医により為された (Fig. 1)。

## 2.3 K-ras 遺伝子コドン 12 点突然変異の検出

ACF の生検組織から、Hoggan<sup>18)</sup> らの方法に従い、DNA を抽出した。Levi ら<sup>19)</sup> の方法に従い、K-ras コドン 12 を含む 2 対の mismatch primers を作製し、上述の DNA を鋳型として 2 段階の (nested) PCR を行った。得られた PCR 産物を MvaI を用いて消化し、2% agarose gel にて電気泳動後、Restriction fragment length polymorphism 解析により変異を検出した (PCR-RFLP)。陽性コントロールとして K-ras point mutation の確認されている膵癌細胞株 AsPC-1 (CRL1682, American Tissue Culture Collection より購入) を、陰性コントロールとして ACF の認められ

ない正常粘膜の生検組織を用いた。

## 2.4 統計学的分析

各疾患における、ACF 陽性率の比較は、logistic regression analysis で、type S, type L の出現頻度は Fisher's exact test により行った。各疾患における ACF 数の比較は Welch's *t* test により行なった。腺腫数と ACF 数の相関は Spearman's test により検討した。

## 3 結 果

### 3.1 ACF の分布

大腸癌患者、大腸腺腫患者、正常人の各 1 名について、全大腸の ACF の分布を拡大内視鏡で観察した。大腸癌患者では、直腸から S 状結腸、上行結腸にかけて 15 個の ACF が観察された (Fig. 2)。

そのうちの典型的な ACF 内視鏡像と病理組織像を Fig. 3 に示す。17 個のメチレンブルーに濃染する crypt からなり、病理組織学的にはこれまで手術標本で報告されてきた腺管の分枝等、ACF の特徴を備えたもので

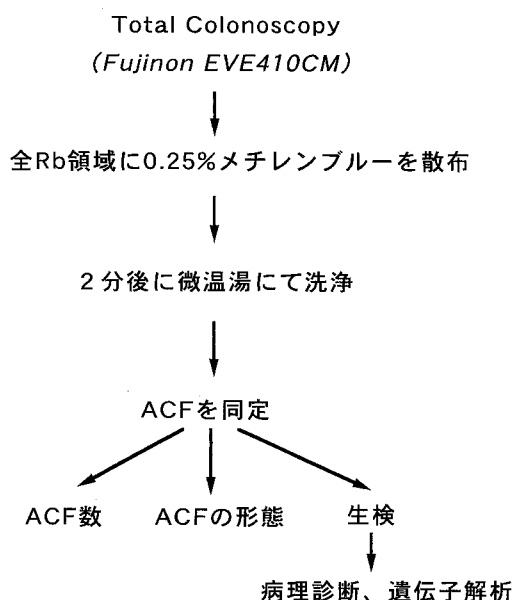
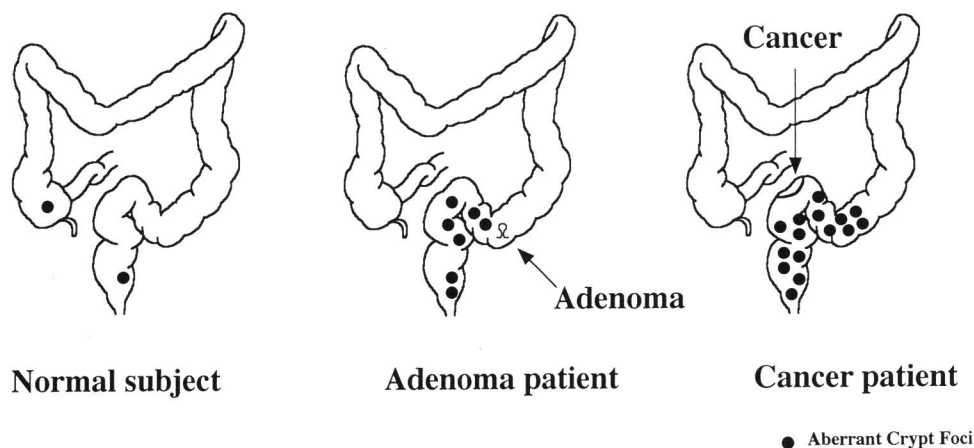


Fig. 1 Scheme for the examination of ACF by magnifying endoscopy. EVE 410CM endoscope (Fujinon, Tokyo, Japan) with an observation depth of 4~50 mm, magnification power of 40× and high sensitivity CCD (410,000 pixels) was used for magnifying colonoscopy. The procedure included washing of mucosal walls with 0.5% glycerin, spraying 0.25% methylene blue solution, and washing with warm water prior to endoscopic observation.

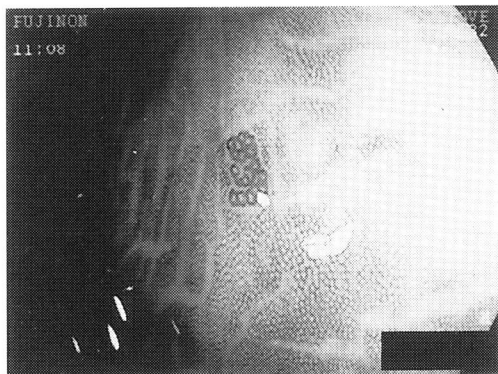
あった<sup>15)16)</sup>。腺腫患者では、やはり直腸からS状結腸にかけて7個のACFが認められ、また正常人では直腸に1個、盲腸に1個のACFが認められた(Fig. 2)。以上のことから、正常人や大腸腺腫患者にもACFは存在

しその大部分は、Roncucci<sup>14)</sup>やPretlow<sup>16)</sup>らの報告と同様に、直腸、あるいはS状結腸に分布することが明らかとなった。そこで、得られた所見に基づき、観察時間を短縮するために、以後の研究は中直腸横ひだか

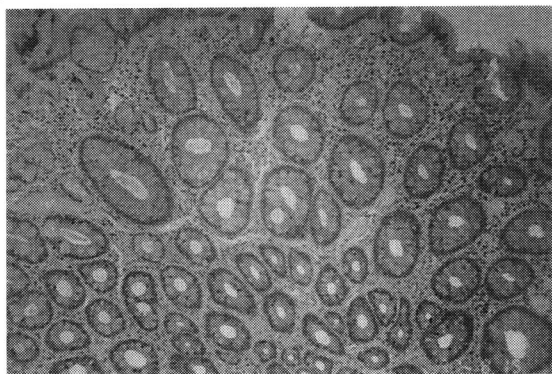


**Fig. 2** Distribution of ACF in the colorectum of normal subject, adenoma patient, and cancer patient. In three cases (NS, AP, CP each), the entire colorectum was examined for ACF. They were mainly localized in the rectosigmoidal region.

A



B



**Fig. 3** A typical feature of ACF from a patient with colon cancer.

Fig. 3A shows a large size ACF (type L ACF) consisting of 17 crypts, each with semi-round or oval shapes. Fig. 3B shows a histological finding of biopsied specimen of the ACF. Slight enlargements and bifurcation of the crypts were observed.

**Table 1** Incidence of ACF in normal subjects, adenoma patients and cancer patients

Total subjects (M/F)		ACF positive subjects (M/F)		P<0.001
Normal subjects	52 (33/19)	32 (20/12)	( 61.5%)	
Adenoma patients	84 (53/31)	75 (49/26)	( 89.3%)	
Cancer patients	27 (19/ 8)	27 (19/ 8)	(100.0%)	

P<0.01 for the comparison between NS and AP or NS and CP by logistic regression analysis.

P<0.05 for the comparison between AP and CP by logistic regression analysis.

ら歯状線までの領域，すなわち下部直腸領域に限って行うこととした。

### 3.2 正常人，大腸腺腫及び大腸癌患者における ACF 陽性率

上述の研究で正常人や腺腫患者にも ACF が存在することが明らかとなったので，研究対象を Table 1 に示すように拡大し，両者における ACF の陽性率を大腸癌患者のそれと比較検討することとした。その結果，Table 1 に示すように，正常人 52 例中 32 例 (61.5%)，腺腫 84 例中 75 例 (89.3%)，大腸癌 27 例中 27 例 (100%) に ACF の存在が確認された。つまり ACF の陽性率は，正常人から腺腫，さらに大腸癌へと統計学的有意差をもって上昇することが確認された。尚，各群間に性差，平均年齢差は認められなかった。

### 3.3 正常人，大腸腺腫及び大腸癌患者における ACF 数

3.2 と同じ対象者においてひとりあたりの平均 ACF 数を検討した。その結果，Fig. 4 に示すように正常人では  $1.73 \pm 2.52$ ，腺腫では  $8.78 \pm 11.16$ ，大腸癌では  $23.07 \pm 16.24$  と，やはり正常人，大腸腺腫，癌患者の順に ACF 数の有意な増加が認められた。

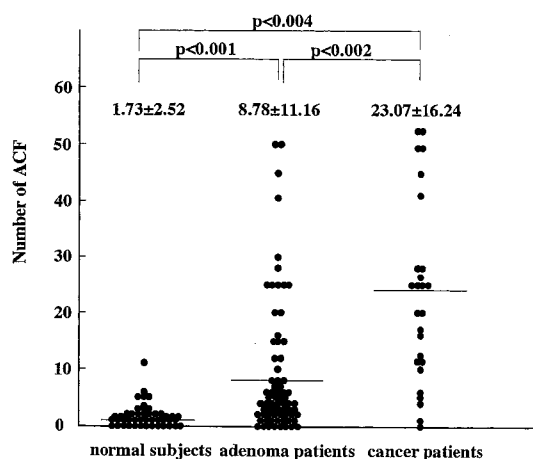


Fig. 4 Number of ACF in normal subjects, adenoma patients and cancer patients.

The average number of ACF showed increment from NS ( $1.73 \pm 2.52$ ) to AP ( $8.78 \pm 11.16$ ) and CP ( $23.07 \pm 16.24$ ) with each significant difference.

### 3.4 大腸腺腫患者における腺腫数と ACF 数の相関性

ACF が大腸腺腫の発生母地であると仮定すると，大腸腺腫患者では腺腫の数が多い程 ACF の数も多いことが予想される。そこで両者の相関性について検討した。その結果，Fig. 5 に示すように，有意な相関性 ( $P <$

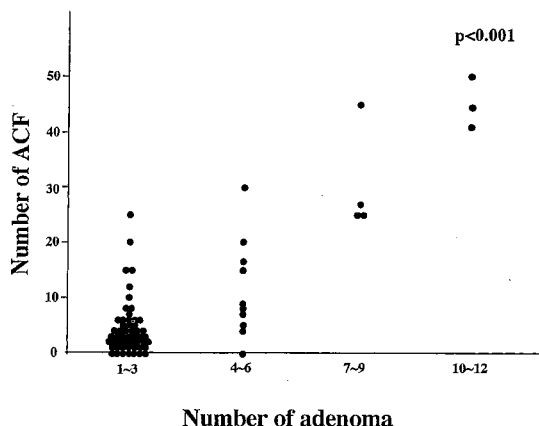


Fig. 5 Correlation between the number of ACF and the numbers of adenomas.

A significant positive correlation ( $P < 0.001$ ) was observed between the numbers of ACF and the numbers of adenomas in AP.

Table 2 Coincidental rates of endoscopic diagnosis with histological diagnosis for ACF

		Endoscopic diagnosis	
		ACF (+)	ACF (-)
Histological diagnosis	ACF (+)	44	0
	ACF (-)	1	34

Sensitivity: 100%

Specificity: 97.1%

0.001) が確認された。

### 3.5 内視鏡的診断と病理診断との一致率

内視鏡的 ACF の診断がどの程度病理学的な診断と一致するかということについても検討を加えた。病理学的診断は，方法の項で述べたように二人の独立した病理学者によって診断の一致したものに限って検討を加えた。その結果は Table 2 に示すように高い特異度及び感度が確認され，ACF の内視鏡的診断の妥当性が確認された。

### 3.6 正常人，大腸腺腫及び大腸癌患者における ACF の大きさの検討

ACF を type S (10 crypts/foci 未満) と type L (10 crypts/foci 以上) に分類し，正常人，大腸腺腫及び大腸癌における両 type の出現頻度を比較検討した。その結果，Table 3 に示すように正常人，腺腫患者，癌患者の順に Type L の割合が有意に増加した。

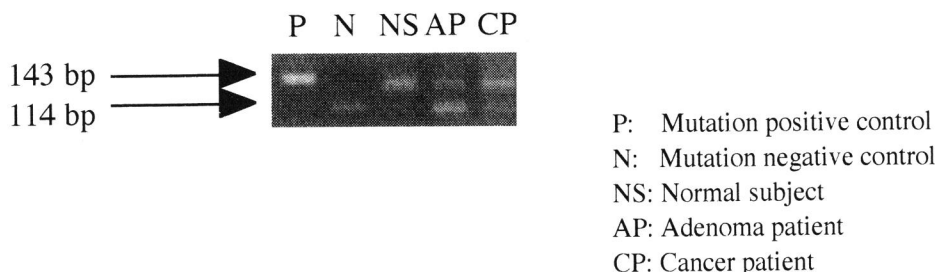
### 3.7 ACF における K-ras コドン 12 点突然変異の頻度

正常人 8 名，腺腫 20 名，癌患者 4 名の ACF における K-ras コドン 12 点突然変異の有無を two step (nest-

**Table 3** Incidence of type S and type L of ACF in normal subjects, adenoma and cancer patients

Subjects	total number of ACF examined	number of Type S ACF (%) (1~9 crypts/focus)	number of Type L ACF (%) (10 crypts/focus $\leq$ )
Normal	90	80 (89)	10 (11)
Adenoma	738	325 (44)	413 (56) <sup>a</sup>
Cancer	623	75 (12)	548 (88) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Normal vs adenoma, adenoma vs cancer are significantly different at  $P < 0.0001$

**Fig. 6** K-ras mutation of ACF. Each lane represents a result obtained from ACF of a normal subject, an adenoma patient and a cancer patient.**Table 4** Incidence of K-ras mutation for ACF in normal subjects, adenoma patients and cancer patients

subjects	Total number of ACF examined	number of ras mutation positive ACF (%)
Normal subject	8	7/8 (87.5%)
Adenoma patient	20	18/20 (90%)
Cancer patient	4	4/4 (100%)

ed)PCR 法にて比較検討した。Fig.6 には、正常人、腺腫患者、癌患者それぞれ 1 例について本法によって検出された異常バンドを例示した。いづれの症例についても、正常の K-ras band (114 bp) に加えて、点突然変異を有する 143 bp の異常バンドが認められた。Table 4 にはこのような検討を行った 32 症例の結果をまとめて示してある。正常人では 8 例中 7 例(87.5%)、腺腫 20 例中 18 例(90%)、癌患者 4 例中 4 例(100%) に点突然変異が認められた。

#### 4 考 察

一般にある特定の病変が前癌状態にあることを証明するには、いわゆる追跡研究が最も直接的な手段である。実際 ACF が大腸癌の前癌病変である事は動物を用いた発癌実験で明らかにされてきた<sup>1,2)</sup>。しかしヒトでは、このような研究は事実上不可能であるために、し

ばしば共存状態を証明することが間接的な手段となっている。例えば adenoma-carcinoma sequence 説は、carcinoma in adenoma という病変から提唱されたものである<sup>17)</sup>。ヒトの ACF についても大腸癌患者で多発していることを証明することにより前癌病変（正しくは前腺腫病変）である可能性が指摘された<sup>14)-16)</sup>。しかし ACF から腺腫、癌への過程をより明らかにするためには当然、正常人、腺腫患者、さらには癌患者での ACF の存在様式を知る必要がある。ACF は直径がせいぜい 50  $\mu$ m という小病変であるためこれまでは Roncucci ら<sup>15)</sup> の報告のように手術や剖検により得られた大腸を实体顕微鏡下で検討されてきた。腺腫患者や正常人を対象にする時、もちろんこのような手段をとることができるはずもなく、本研究では拡大内視鏡を用いて ACF を観察することとした。その結果、正常人や腺腫患者にも ACF が存在すること、さらに正常人、腺腫患者、

癌患者となるにしたがい、ACFの頻度、数、大きさが増加すること、ACF数と腺腫数に強い相関があることが明らかとなった。これらのことはヒトにおいてもACFがいわゆる adenoma-carcinoma の前病変として位置することを強く示唆するものであった。またACFの分布が主に左側結腸にあったことは、adenoma (polypoid type) や、cancer の分布が左側結腸に多いことに矛盾しない事実であった<sup>20)</sup>。なお adenoma には数は少ないが superficial type のものもあり、これは約半数が、右側結腸に分布しており<sup>21)</sup>、ACFとの関連性は弱いものと考えられる。また腺腫の頻度がACFの頻度より低いことからACF全てが腺腫に移行するのではなく、おそらく腺腫に進展するのはほんの一部であり、大部分はそのままか、または消失するものと推測される<sup>22)</sup>。Vogelstein らによれば大腸癌への遺伝子変化は、APC 遺伝子、*ras* 遺伝子、*p53* 遺伝子、DCC 遺伝子の順に起こるとされている<sup>22,23)</sup>。ところが本研究でACFの *K-ras* 遺伝子を調べたところ既に高頻度(90%以上)で変異していることが明らかとなり、APCが大腸癌発癌過程における最も初期の遺伝子変化であるとする従来の考え方と異なるものであった。この点についての検討は今後の課題としたい。いずれにしても今回の研究からはACFが腺腫の前病変であることが強く示唆された。このように拡大内視鏡によりACFの観察が可能であるという事実は、臨床的に重要な意味をもっている。それはいままでは難しいとされたヒト大腸癌に対する chemopreventive agent の経時的なモニタリングが拡大内視鏡で可能であるということである。拡大内視鏡により chemopreventive agent 投与下での adenoma 自体を観察するという方法は、発見した adenoma を放置し、経過を追うことであり、倫理的に問題があると思われる。しかし前腺腫病変である ACF であれば、経過観察は容易であり倫理的な問題は生じないであろう。すなわち、拡大内視鏡により、これまでヒトの大腸癌発生に予防効果があるとされるアスピリン等の多くの薬剤の ACF への影響をヒトで直接検討できるということになる<sup>24)</sup>。われわれは今後、大腸癌の chemoprevention という面からも ACF の観察を継続する予定である。

## 5 結 語

正常人、腺腫患者、大腸癌患者の ACF を拡大内視鏡を用いて観察し、ACF の preneoplastic lesion としての意義を検討したところ、以下の結論が得られた。

1. ヒト ACF の大部分は、直腸、あるいは S 状結腸に分布していた。

2. ACF の陽性率は、正常人 61.5%、腺腫患者 89.3%、大腸癌患者 100%であり、正常人、腺腫患者、大腸癌患者に順に有意な増加が認められた。

3. 一人あたりの ACF 数は、正常人  $1.73 \pm 2.52$  個、腺腫患者  $8.78 \pm 11.16$  個、大腸癌患者  $23.07 \pm 16.24$  個であり、正常人、腺腫患者、大腸癌患者の順に ACF の有意な増加が認められた。

4. 腺腫患者において、腺腫数と ACF 数には有意な相関 ( $p < 0.001$ ) が認められた。

5. type L ACF (10 crypts/foci 以上) の割合は、正常人、大腸腺腫患者、大腸癌患者の順に有意に増加していた。

6. 正常人、腺腫患者、大腸癌患者における *K-ras* コドン 12 点突然変異の頻度は、それぞれ 87.5%、90%、100%であった。

以上よりヒト ACF は、adenoma-carcinoma の前病変である可能性が強く示唆された。また拡大内視鏡を用いてアスピリン等多くの chemopreventive agent のモニタリングが可能であると期待された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲いただいた本学内科学第四講座新津洋司郎教授ならびに本論文作成に際し御協力いただいた教室の諸先生に深謝いたします。

## 参考文献

1. Bird RP. Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987, 37: 147-141.
2. McLellan EA, Medline A, Bird RP. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res* 1991, 51: 5270-5274.
3. Caderni G, Bianchini F, Mancina A, Spagnesi M, Dolara P. Effect of dietary carbohydrates on the growth of dysplastic crypt foci in the colon of rats treated with 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1991, 51: 3721-3725.
4. Sutherland LA, Bird RP. The effect of chenodeoxycholic acid on the development of aberrant crypt foci in the rat colon. *Cancer Lett* 1994, 76: 101-107.
5. Takahashi M, Minamoto T, Yamashita N, Kato T, Yazawa K, Esumi H. Effect of docosahexaenoic acid on azoxymethane-induced

- colon carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 1994, 83: 177-184.
6. Mereto E, Frenchia L, Ghia M. Effect of aspirin on incidence and growth of aberrant crypt foci induced in the rat colon by 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett* 1994, 76: 5-9.
7. Yamashita N, Minamoto T, Onda M, Esumi H. Increased cell proliferation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci of rat colon. *Jpn J Cancer Res* 1994, 85: 692-698.
8. Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, Onda M, Esumi H. Frequent and characteristic K-ras activation in aberrant crypt foci of colon. Is there preference among K-ras mutants for malignant progression? *Cancer* 1995, 108: 434-440.
9. Shivapurkar N, Tang Z, Ferreira A, Nasim S, Garrett C, Alabaster O. Sequential analysis of K-ras mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in Fischer-344 rats on high-risk diet. *Carcinogenesis* 1994, 15: 775-778.
10. Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, Onda M, Esumi H. Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon. *Gastroenterology* 1995, 108: 434-440.
11. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85: 2004-2007.
12. Tachino N, Hayashi R, Liew C, Bailey G, Dashwood R. Evidence for ras gene mutation in 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline-induced colonic aberrant crypts in the rat. *Mol Carcinog* 1995, 12: 187-192.
13. Stopera SA, Davie JR, Bird RP. Colonic aberrant crypt foci are associated with increased expression of c-fos: the possible role of modified c-fos expression in preneoplastic lesions in colon cancer. *Carcinogenesis* 1992, 13: 573-578.
14. Roncucci L, Medline A, Bruce WR. Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1991, 1: 57-60.
15. Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 1991, 22: 287-294.
16. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG. Aberrant crypts: Putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 1991, 51: 1564-1567.
17. Morson BC. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc Roy Soc Med* 1974, 67: 451-457.
18. Hoggan MD, Buckler CE, Sears JF, Rowe WP, and Martin MA. Organization and stability of endogenous Xenotropic murine leukemia virus proviral DNA in mouse genomes. *J Virol* 1983; 45: 473-77.
19. Levi S, Urbano IA, Gill R. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* 1991, 51: 3497-3502.
20. 武藤徹一郎. 大腸ポリープ, ポリポーシス: 大腸ポリープの統計および疫学. 東京, 医学書院, 1993, 106-115.
21. Minamoto T, Sawaguchi K, Ohta T, Itoh T, Mai M. Superficial-type adenomas and adenocarcinomas of the colon and rectum: a comparative morphological study. *Gastroenterology* 1994, 106: 1436-1443.
22. Vogelstein B, Fearon ER, Stanley R, *et al.* Genomic alteration during colorectal tumor development. *N Eng J Med* 1988, 319: 525-532.
23. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, 61, 759-767.
24. Okhee S, Curtis M, Nicholas JP. Aspirin use, cancer, and polyps of the Large Bowel. *Cancer* 1993, 72, 1171-1177.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第4講座 勝木伸一